

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant: Paul WURZINGER  
Title: SPECIMEN HOLDER FOR A HIGH-PRESSURE FREEZING DEVICE  
Appl. No.: Unassigned  
Filing Date: 12/20/2001  
Examiner: Unassigned  
Art Unit: Unassigned



**CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY**

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

In support of this claim, filed herewith is a certified copy of said original foreign application:

- Federal Republic of Germany Patent Application No. 100 65 143.7 filed December 23, 2000.

Respectfully submitted,

By

Date: December 20, 2001

FOLEY & LARDNER  
Washington Harbour  
3000 K Street, N.W., Suite 500  
Washington, D.C. 20007-5143  
Telephone: (202) 672-5426  
Facsimile: (202) 672-5399

Glenn Law  
Attorney for Applicant  
Registration No. 34,371



016720/0426  
WueZinger

JCS03 U.S. PTO

10/022528



12/20/01

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 65 143.7  
**Anmeldetag:** 23. Dezember 2000  
**Anmelder/Inhaber:** Leica Mikrosysteme GmbH, Wien/AT  
**Bezeichnung:** Probenhalter für eine Hochdruckgefriereinrichtung  
**IPC:** G 01 N, C 12 M, B 01 L

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 02. November 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Weinmayer

### **Probenhalter für eine Hochdruckgefriereinrichtung**

Die Erfindung betrifft einen Probenhalter für eine Hochdruckgefriereinrichtung, gemäss dem Oberbegriff des Anspruches 1.

5 Unter einer Hochdruckgefriereinrichtung im Sinne der Erfindung versteht man eine Gefrieranlage für das schnelle Einfrieren (Vitrifizieren) wasserhaltiger Proben unter hohem Druck. Derartige Einrichtungen sind in der DE-PS-1806741, der EP 0853238 A1 und der EP 0637741 A1 beschrieben.

Eine solche Hochdruckgefriereinrichtung wird von der Anmelderin unter dem Namen „Leica EM HPF“ erfolgreich vertrieben und ist in der Druckschrift „LEICA  
10 EM HPF, High Pressure Freezer, 1.K.-LEICA EM HPF-E-6/94, Juni 1994“ dargestellt.

Die Hochdruckgefriereinrichtung „Leica EM HPF“ erlaubt es, herkömmliche Proben unter einem Druck von etwa 2000 bar mit einer Abkühlungsrate von  $10^3 - 10^5$  K/s zu vitrifizieren. Die entscheidende Abkühlungsphase von  
15 Raumtemperatur auf  $-100^\circ\text{C}$  dauert bei diesem bekannten Gerät an der Oberfläche der Probe (Abkühlrate  $10^4$  K/s) etwa 10ms.

Die Abkühlrate im Innern der Probe ist ausschließlich von den physikalischen Eigenschaften der Probe abhängig. Um dickere biologische bzw. wasserhaltige Proben zu vitrifizieren, wird die Probe einem hohen Druck ausgesetzt.

5 Durch die Anhebung des Drucks ist eine kleinere Abkühlrate zur Vitrifizierung hinreichend. Die Abkühlrate zur Vitrifizierung biologischer Proben beträgt unter Normaldruck etwa  $10^5$ - $10^6$  K/s, unter 2000bar beträgt die Abkühlrate jedoch nur  $10^3$ - $10^4$  K/s; d.h. mit hundert mal geringeren Abkühlraten können unter hohem Druck biologische Proben immer noch vitrifiziert werden.

10 Zum Einfrieren der Proben werden metallische Halter verwendet, die mindestens zwei lösbar miteinander verbindbare Formteile aufweisen, wobei die miteinander verbundenen Formteile eine Kammer zur Aufnahme der Proben bilden. In der o.a. Druckschrift „LEICA EM HPF, High Pressure Freezer, 1.K.-LEICA EM HPF-E-6/94, Juni 1994“ und der Druckschrift „Balzers, Hochdruck-Gefriermaschine HPM 010, Balzers Union Aktiengesellschaft, ohne Druckdatum“ sind derartige  
15 Probenhalter dargestellt.

Zum Einfrieren der Probe wird der Probenhalter in der Hochdruckgefriereinrichtung so eingespannt, dass einerseits ein Probenverlust vermieden wird und andererseits ein ausreichender Teil der Oberfläche zum  
20 Aufspritzen von Kryogen, z. B. von Flüssigstickstoff, frei zugänglich bleibt. Eine derartige Anordnung ist in der nicht vorveröffentlichten DE 100 15 773 dargestellt und beschrieben.

Aus der bekannten Technik des Abkühlens und der physikalischen Abläufe ist es auch bekannt, dass die Abkühlrate im Zentrum einer biologischen Probe nur bedingt durch die Abkühlrate an der Oberfläche bestimmt wird. Wesentliches  
25 Merkmal dabei ist, dass bei hohen Abkühlraten an der Oberfläche eine Art „Sättigungseffekt“ eintritt, während niedrigere Abkühlraten an der Oberfläche unweigerlich schlechte Einfrierergebnisse zur Folge haben. Deshalb ist es wesentlich, dass die durch ein Gerät erzielbare Abkühlrate möglichst ungeschmälert durch die Probenhalterung auf die Oberfläche der biologischen  
30 Probe übertragen wird.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Probenhalter für eine Hochdruckgefriereinrichtung zu schaffen, der die erzielbare Abkühlrate möglichst ungeschmälert auf die Oberfläche der Probe überträgt.

5 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die im Kennzeichen des Patentanspruchs 1 angegebenen Merkmale gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

10 Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, dass eines der Formteile aus Diamant besteht oder zumindest einen Diamanten aufweist. Der Diamant hat neben seiner extremen Härte auch den Vorteil der niedrigen spezifischen Wärme und der sehr guten Wärmeleitfähigkeit.

15 In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung ist mindestens eines der Formteile, vorzugsweise das aus Diamant gefertigte Formteil, scheibenförmig ausgebildet. Zwischen beiden Formteilen ist ein aus Metall gefertigter Distanzring vorgesehen, der die zur Probenaufnahme notwendige Vertiefung bestimmt. Dieser Distanzring kann hier auch die Dichtfunktion übernehmen.

20 Es kann natürlich auch vorgesehen sein, dass nur eines der Formteile aus Diamant gefertigt ist bzw. das Formteil einen gefassten Diamanten aufweist. In diesem Fall kann die Vertiefung für die Probenaufnahme durch die Fassung des Diamanten oder durch eine entsprechende Ausbildung des anderen Formteils erfolgen. Ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel ist ein Probenhalter mit einem scheibenförmigen Formteil aus Diamant und einem scheibenförmigen aus Metall. Das Metallformteil weist am Rand einen umlaufenden, angeformten Steg auf.

25 In einer weiteren Ausführungsform des Probenhalters kann der Diamant bzw. eines der Formteile mit einer Bohrung für die Hochdruckzuführung ausgestattet sein.

Es hat sich von Vorteil erwiesen, bei derartigen Probenhaltern als Metall Gold oder Aluminium oder Kupfer zu verwenden und als Diamanten einen handelsüblichen polykristallinen CVD Industriediamanten einzusetzen.

In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung sind beide Formteile an ihren nach innen gerichteten Flächen plan ausgebildet. Zwischen diesen Flächen ist ein, die Flächen umlaufendes, Distanzstück als Dichtung und zur Bildung der Probenaufnahme angeordnet. Durch unterschiedlich dimensionierte  
5 Distanzstücke lassen sich auf einfache Art und Weise unterschiedlich dimensionierte Aufnahmen für die Proben erzeugen.

Die Erfindung wird in mehreren Ausführungsbeispielen anhand der schematischen Zeichnungen dargestellt und näher erläutert. Es zeigen:

- 10 Fig. 1: Eine Schnittdarstellung des Probenhalters mit zwei aus Diamant hergestellten Formteilen und umlaufendem Metallring,
- Fig. 2: eine Schnittdarstellung des Probenhalters mit einem Formteil aus Diamant und einem Formteil aus Metall,
- 15 Fig. 3: eine Schnittdarstellung des Probenhalters mit zwei Formteilen aus Diamant und einem zusätzlichen Formteil mit Hochdruckzuführleitung,
- Fig. 4: eine Schnittdarstellung des Probenhalters mit einem Formteil aus Diamant und einem anderen Formteil mit Hochdruckzuführleitung,
- 20 Fig. 5: eine Schnittdarstellung des Probenhalters mit einem Formteil aus Diamant und einem eine Probenaufnahme und eine Dichtung bildendes Formteil.

Die Figur 1 zeigt einen Probenhalter 1 mit einem Formteil 2 und einem diesem gegenüberliegen angeordneten Formteil 3. Beide Formteile 2 und 3 sind aus Diamant hergestellt und als scheibenförmige Plättchen ausgebildet. Zwischen den beiden Formteilen 2 und 3 ist ein Distanzring 9 vorgesehen, der  
25 vorzugsweise aus Metall besteht. Als Metall wird hier vorzugsweise Gold, Kupfer oder Aluminium verwendet. Die Größe des Distanzrings 9 bestimmt dabei die Größe der Probenaufnahme 6. So lassen sich auf einfache Art und Weise unterschiedlich große Probenaufnahmen 6 durch unterschiedliche dimensionierte Distanzringe 9 realisieren.

Über den Distanzring 9 wird die Probenaufnahme 6 beim Einspannen in eine nicht mit dargestellte Spanneinrichtung einer Hochdruckgefriereinrichtung isoliert.

Die Figur 2 zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel des Probenhalters 1 mit einem aus Diamant gefertigten Formteil 2 und einem gegenüberliegend angeordneten und aus Metall hergestellten Formteil 3. Das Formteil 3 weist am Rand angeformte und den Rand umlaufende Stege 8 auf, die die Funktion des Distanzrings 9 aus der Figur 1 übernehmen. Durch die unterschiedliche Dimensionierung der Stege 8 lassen unterschiedliche große Probenaufnahmen 6 realisieren. Durch die angeformten Stege 8 wird eine feste Probenaufnahme 6 gebildet und dadurch das Einlegen und Entnehmen der Probe erleichtert.

Die Figur 3 zeigt einen Probenhalter 1 entsprechend der Ausführungsform der Figur 1, wobei hier im Formteil 3 eine Bohrung 10 für eine nachgeordnete, hier nicht mit dargestellte, Hochdruckeinrichtung vorgesehen ist. Dem Formteil 3 ist ein weiteres Formteil 4 mit einem Hochdruckkanal 5 zugeordnet. Der Hochdruckkanal 5 korrespondiert mit der Bohrung 10, die in der Probenaufnahme 6 endet. Auf diese Weise lässt sich direkt in der Probenaufnahme 6 der notwendige Druck erzeugen.

Die Figur 4 zeigt ein Ausführungsbeispiel des Probenhalters 1 entsprechend der Figur 4, wobei hier das Formteil 4 direkt über die Dichtung 9 mit dem Formteil 2 verbunden ist. In diesem Ausführungsbeispiel wurde das Formteil 3 vollständig ersetzt.

Die Figur 5 zeigt ein Ausführungsbeispiel des Probenhalters 1 gemäß der Figur 4, wobei hier der umlaufende Distanzring 9 zur Dichtung durch das metallische Formteil 3 mit einem Boden 7 und den umlaufend angeformten Stegen 8 ersetzt wurde. Dieses Formteil entspricht dem Formteil 3 aus der Figur 2, wobei hier der Boden 7 möglichst dünn ausgebildet ist. Da das Formteil 3 auch hier lösbar im Probenhalter 1 angeordnet ist, kann das Formteil 3 separat entnommen werden. Dadurch können die Proben leichter in den Probenhalter 1 bzw. in die Probenaufnahme 6 eingebracht und wieder entnommen werden.

Die beschriebenen und aus Diamant, vorzugsweise aus einem polykristallinen CVD Diamanten, gefertigten Formteile können selbstverständlich auch einen oder mehrere gefasste Diamanten aufweisen.

- Es liegt selbstverständlich auch im Rahmen der Erfindung, wenn die äußere
- 5 Oberfläche der Formteile unregelmäßig ausgebildet ist, um so eine größere Fläche zum Aufspritzen von Flüssigstickstoff zu bilden.



### Bezugszeichenliste

	1 -	Probenhalter
	2 -	Formteil
	3 -	Formteil
5	4 -	Formteil
	5 -	Hochdruckkanal
	6 -	Probenaufnahme
	7 -	Boden
	8 -	Steg
10	9 -	Distanzring
	10 -	Bohrung

### Patentansprüche

1. Probenhalter (1) für wasserhaltige Proben zum Hochdruckgefrieren, wobei der Probenhalter (1) mindestens zwei lösbar miteinander verbindbare Formteile (2, 3; 2, 4) aufweist und die verbundenen Formteile (2, 3; 2, 4) eine Aufnahme (6) für die Probe bilden, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens  
5 eines der Formteile (2; 3) einen Diamant aufweist.
2. Probenhalter (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Formteil (2; 3) scheibenförmig ausgebildet ist.
3. Probenhalter (1) nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass  
10 zwischen den Formteilen (2; 3) ein aus Metall gefertigter Distanzring (9) angeordnet ist.
4. Probenhalter (1) nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass beide Formteile (2; 3) als scheibenförmige Diamanten ausgebildet sind.
5. Probenhalter (1) nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass  
15 das andere Formteil (3) aus Metall gefertigt, scheibenförmig ausgebildet und einen angeformten und am Rand umlaufenden Steg (8) aufweist.
6. Probenhalter (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Diamant eine Bohrung (10) für die Hochdruckzuführung aufweist.
7. Probenhalter (1) nach Anspruch 3 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass  
20 als Metall Gold oder Aluminium oder Kupfer verwendet wird.
8. Probenhalter (1) nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass beide Formteile (2; 3) an ihren nach innen gerichteten Flächen plan ausgebildet sind und zwischen diesen Flächen ein die Flächen umlaufendes Distanzstück (9) als Dichtung und zur Bildung der Probenaufnahme (6) angeordnet ist.

9. Probenhalter (1) nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Diamant als polykristalliner CVD Diamant ausgebildet ist.

10. Probenhalter (1) nach mindestens einem der vorherigen Ansprüche,  
5 dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der Formteile (2, 3, 4) mit einer unregelmäßig geformten Oberfläche ausgebildet ist.

### Zusammenfassung

Es wird ein Probenhalter (1) für wasserhaltige Proben zum Hochdruckgefrieren beschrieben, wobei der Probenhalter (1) mindestens zwei lösbar miteinander verbindbare Formteile (2, 3) aufweist und die verbundenen Formteile (2, 3) eine Aufnahme (6) für die Probe bilden. Mindestens eines der Formteile (2; 3) weist einen Diamanten auf.

(Fig. 1)

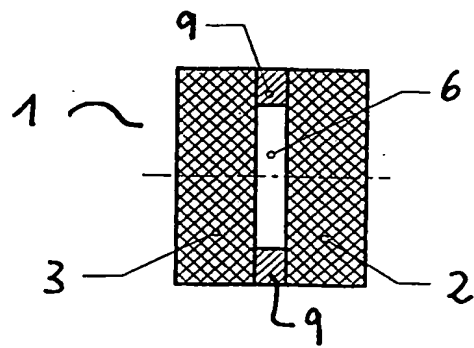


Fig 1

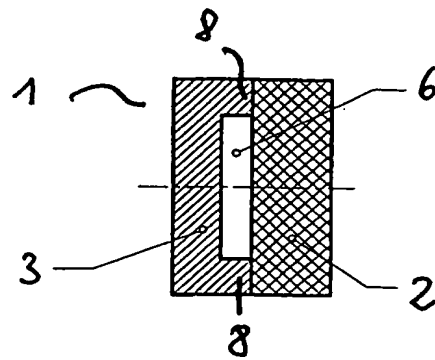


Fig 2

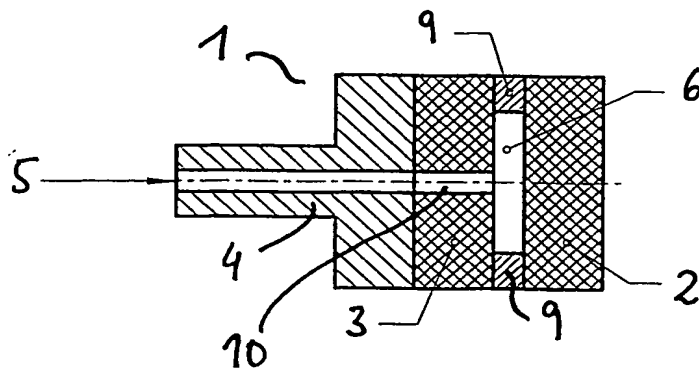


Fig 3

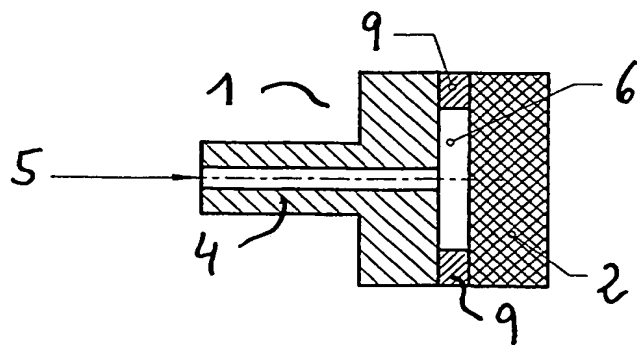


Fig 4

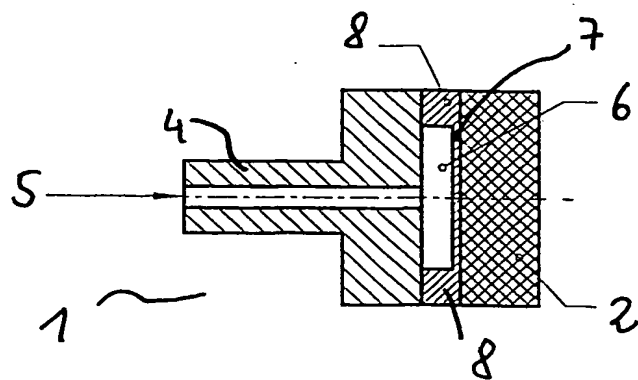


Fig 5